

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-301629

(P2004-301629A)

(43) 公開日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78 B	2 GO 4 2
GO 1 N 31/22	GO 1 N 31/22 1 2 1 N	2 GO 4 5
GO 1 N 33/52	GO 1 N 33/52 B	2 GO 5 4

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2003-94268 (P2003-94268)	(71) 出願人	591125371
(22) 出願日	平成15年3月31日 (2003.3.31)		デンカ生研株式会社
			東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号
		(74) 代理人	100059959
			弁理士 中村 稔
		(74) 代理人	100067013
			弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 呈色物測定方法

## (57) 【要約】

【課題】従来定量化が困難であった試料中の被分析物濃度を定量的に測定する方法及び前記方法に使用し得るキット及び装置を提供し、また、前記キット及び装置の性能を検査することにより品質を管理する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】試料中の被分析物に基づく呈色領域と所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、得られた各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較することにより、前記試料中の被分析物濃度を定量的に測定する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

呈色を利用して試料中の被分析物濃度を測定する方法であって、捕捉体が結合した担体上に捕捉された前記被分析物に基づく呈色領域と所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、測定した各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較して、前記被分析物濃度を定量することを含む、上記方法。

**【請求項 2】**

試料中の被分析物の担体上への捕捉が免疫反応を利用した捕捉である、請求項 1 に記載の測定方法。

**【請求項 3】**

呈色が酵素反応による呈色または着色粒子による呈色である、請求項 1 または 2 に記載の測定方法。

**【請求項 4】**

試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が試料中の被分析物に対するレセプターである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の測定方法。

**【請求項 5】**

試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び所定の明度を有する領域を有する基準プレートを備えた、呈色を利用して前記被分析物濃度を定量的に測定するための装置。

**【請求項 6】**

捕捉体が被分析物に対するレセプターである、請求項 5 に記載の装置。

**【請求項 7】**

呈色が酵素反応による呈色または着色粒子による呈色である、請求項 5 または 6 に記載の装置。

**【請求項 8】**

試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体、前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬、及び所定の明度を有する領域を有する基準プレートを含む、呈色を利用して前記被分析物濃度を定量的に測定するためのキット。

**【請求項 9】**

さらに、呈色領域を撮像する撮像手段を含む、請求項 8 に記載のキット。

**【請求項 10】**

試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体を含む、呈色を利用して前記被分析物濃度を測定するための装置の品質管理方法であって、前記捕捉体が結合した担体と所定濃度の被分析物を含む標準試料とを接触させ、さらに前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬を接触させることにより、捕捉体／被分析物／試薬の複合体を形成し、前記試薬に基づく呈色領域と、所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、測定した各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較することにより前記装置の性能を検査することを特徴とする、装置の品質管理方法。

**【請求項 11】**

試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬を含む、呈色を利用して前記被分析物濃度を測定するためのキットの品質管理方法であって、前記捕捉体が結合した担体と、前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する前記試薬と、所定濃度の被分析物を含む標準試料とを接触させることにより、捕捉体／被分析物／試薬の複合体を形成し、前記試薬に基づく呈色領域と、所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、測定した各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較することにより前記キットの性能を検査することを特徴とする、キットの品質管理方法。

**【請求項 12】**

試料中の被分析物の担体上への捕捉が免疫反応を利用した捕捉である、請求項 10 または 11 に記載の品質管理方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

呈色が酵素反応による呈色または着色粒子による呈色である、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の品質管理方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は呈色を利用して試料中の被分析物濃度を測定する方法、装置及びキット、並びに装置及びキットの品質管理方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

臨床検査分野、食品検査の分野等において、呈色を利用した試料中の被分析物濃度を測定する方法が種々知られている。例えば、ウイルスや細菌の有無を検査する方法として、酵素で標識したウイルスや細菌の抗体または抗原と試料中のそれらの抗体または抗原との反応を、酵素反応に由来する呈色反応を利用して検出する、酵素免疫測定法がある。また、酵素を利用しない免疫測定法としては、メンブレンフィルター上に第一の抗体を固定化し、金コロイドのような着色粒子と第二の抗体との複合体を用いて試料中の抗原をフィルター上に捕捉し、金コロイドによる着色により抗原の存在を検出する方法が知られている。上記方法において、呈色の有無を測定することにより試料中の被分析物の有無を検出できる。しかし、呈色の度合は試料中の被分析物量に対して連続的に変動するため、肉眼で呈色の有無を判断するのは困難な場合がある。また、肉眼での判断は検査実施者の熟練度や個人差が大きく影響するため、正確な判断が困難であるという問題もある。これらの方法において、溶液中で反応を行う型のは着色した溶液の透過度等の測定により定量化が進んでいるが、フィルター等の上で反応を行う固相型のものの呈色は発色のばらつきが大きい

10

ため、定量化が特に困難であった。ここで、複数の検査項目を分析する場合に被測定物または測定光学系の移動の必要を無くし、また装置や試験紙等の小型化を目的として、試験紙の呈色を CCD カメラ等により撮像情報として取り込み色分析する方法が報告されている（例えば特許文献 1 参照）。

20

## 【0003】

## 【特許文献 1】

特 2001-349834 号公報

30

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来定量化が困難であった試料中の被分析物濃度を定量的に測定する方法及び前記方法に使用し得るキット及び装置を提供することを目的とする。本発明はまた、呈色を利用して試料中の被分析物を測定するキット及び装置の性能を検査することによりそれらの品質を管理する方法を提供することを目的とする。

## 【0005】

## 【課題を解決するための手段】

上記課題は、呈色を利用して試料中の被分析物濃度を測定する方法であって、捕捉体が結合した担体に捕捉された前記被分析物に基づく呈色領域と所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、測定した各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較して、前記被分析物濃度を定量化することを含む、上記方法により解決される。

40

## 【0006】

また、本発明は、試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び所定の明度を有する領域を有する基準プレートを備えた、呈色を利用して試料中の被分析物濃度を定量的に測定するための装置に関する。

## 【0007】

本発明はまた、試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体、前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬、及び所定の明度を有する領域を有する基準プレートを含む、呈色を利用して試料中の被分析物濃度を定量的に測定するためのキットに関する。

50

## 【0008】

また本発明は、試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体を含む、呈色を利用して前記被分析物濃度を測定するための装置の品質管理方法であって、前記捕捉体が結合した担体と所定濃度の被分析物を含む標準試料とを接触させ、さらに前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬を接触させることにより、捕捉体／被分析物／試薬の複合体を形成し、前記試薬に基づく呈色領域と、所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、測定した各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較することにより前記装置の性能を検査することを特徴とする、装置の品質管理方法に関する。

## 【0009】

さらに本発明は、試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬を含む、呈色を利用して前記被分析物濃度を測定するためのキットの品質管理方法であって、前記捕捉体が結合した担体と、前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する前記試薬と、所定濃度の被分析物を含む標準試料とを接触させることにより、捕捉体／被分析物／試薬の複合体を形成し、前記試薬に基づく呈色領域と、所定の明度を有する領域とを同時に撮像して各領域の明度を測定し、測定した各領域の明度の比を予め作成した検量線と比較することにより前記キットの性能を検査することを特徴とする、キットの品質管理方法を提供する。

## 【0010】

本発明の方法は、試料中の被分析物濃度に基づく呈色領域の明度を測定して、被分析物濃度を定量的に測定する方法に関する。明度の測定は撮像手段や撮像条件等により大きく変動しやすいため、予め作成した、明度比と試料中の被分析物濃度との検量線を利用しても、精度良く被分析物濃度の定量化を行うことができなかった。これに対し、本発明は、所定の明度の領域を有する基準プレート等を用意し、この基準明度の領域と、試料中の被分析物濃度に基づく呈色領域とを同時に撮像し、各領域の明度を測定してその比を得ることにより、精度良く試料中の被分析物濃度の定量化を行うことができたものである。

また、本発明の品質管理方法により、上記キットや装置中の捕捉体や試薬の性能を簡便に検査することができ、キットや装置の品質管理を行うことができる。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】

本発明について以下に説明する。

## 〔呈色〕

本発明において、“呈色を利用して”とは、試料中の被分析物の存在を検出するために発色を利用すること（いわゆる発色法）を意味する。例えば、呈色は、酵素反応による呈色または着色粒子による呈色が挙げられる。すなわち、本発明の測定方法が酵素免疫測定法である場合、酵素で標識化した抗体と、この抗体と反応し得る被分析物である抗原とが免疫反応により結合した後、前記標識酵素と反応して発色する化合物を添加することにより発色（呈色）して、被分析物である抗原の存在を検出することができる。また、酵素を利用しない免疫測定法では、担体上に第一の抗体を固定化し、第一の抗体と、金コロイドのような着色粒子と第二の抗体との複合体とを用いて試料中の抗原を担体上に捕捉し、金コロイド等による着色（呈色）から被分析物である抗原の存在を検出することができる。

## 【0012】

## （酵素反応による呈色）

本発明において、呈色が酵素反応を利用する場合について説明する。

“呈色が酵素反応を利用する”とは、いわゆる酵素免疫測定法を利用した呈色形成を意味する。すなわち、試料中の被分析物に特異的に結合する酵素標識化された抗体等の試薬を使用して、試料中の被分析物と特異的に結合させた後、酵素により分解して発色する基質を添加することにより、呈色を形成させるものである。

酵素反応に使用される酵素は、従来、酵素免疫測定法において標識酵素として公知のものいずれのものでもよく、例えば、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素が挙げられる。

10

20

30

40

50

また、上記標識酵素を用いた場合には、通常その酵素に対する基質であって、該酵素により触媒される反応により発色して検出し得る被分析物を生成する基質を添加する。具体例としては、これらに限定されないが、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP) / ニトロテトラゾリウムブルー (NBT)、テトラメチルベンチジン (TMB)、グルコース-6-リン酸NAD+が挙げられる。

#### 【0013】

本発明の方法ではさらに必要により、例えば酵素と基質との反応を停止させるための反応停止液を使用してもよい。このような反応停止液としては、例えば、クエン酸、硫酸等が挙げられる。

#### 【0014】

(着色粒子による呈色)

着色粒子とは、本明細書において、水、緩衝液等の試料浮遊液に不溶性である粒子状物質であって、色素等による着色標識化物等、視覚により検出可能な標識化物を意味する。着色粒子は後述する試料中の被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬に結合して使用する。吸着などの手段により前記試薬に結合することが必要である。また、前記試薬に結合した着色粒子それ自身(すなわち被分析物と結合しなかったもの)は担体中を通過して担体表面には残存しないことが必要であるので、担体のポアサイズよりある程度小さいサイズの粒子であることが必要である。担体の種類にもよるが、通常、直径が0.01~1 $\mu$ m程度の大きさの粒子であることが好ましい。このような着色粒子としては、例えば金コロイド、着色ラテックス等が挙げられる。

#### 【0015】

(試料中の被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬)

本発明のキットにおいて、試料中の被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬(以下、“試薬”と称する場合もある)とは、上述した酵素標識または着色粒子により標識された試薬を意味する。試薬は試料中の被分析物に免疫反応等のように特異的反応により結合するものであればいずれのものでもよく、後述する捕捉体として挙げられたものと同じものが挙げられる。より具体的には、試料中の被分析物と特異的に反応し、複合体を形成しえるレセプター、より具体的には抗体、抗原等を意味する。

本発明において、試薬は酵素標識レセプターまたは着色粒子により標識されたレセプターであることが好ましい。

#### 【0016】

以下、試薬が酵素標識レセプターまたは着色粒子により標識されたレセプターである場合について説明する。

試薬が酵素標識レセプターである場合は、公知の酵素免疫測定法において使用されている酵素標識抗体等の製造方法及び使用方法をそのまま適用することができる。例えば、「石川榮治著 超高感度酵素免疫測定法(学会出版センター発行)」等の記載が参照される。レセプターを着色粒子へ結合させるには、物理的吸着法、化学的結合法等を利用することができる。物理的吸着法としては、例えば適当な溶媒中に浮遊した着色粒子を試料中の被分析物に対するレセプターに接触させる方法が挙げられる。レセプター吸着後、着色粒子表面の吸着に関与しなかった部分を被覆するため、ウシ血清アルブミン等のタンパク性ブロッキング剤で処理し、その後遠心分離、あるいは限外濾過法などによりレセプターが結合(吸着)した着色粒子と吸着しなかった過剰のレセプターとを分離する。また、化学的結合法としては、カルボキシル基、アミノ基等の官能基を介して共有結合を形成させる方法が挙げられる。各着色粒子に結合可能なレセプター濃度は、着色粒子の材質、大きさ(粒径、表面積)等により異なるため、当業者が適宜決定することができる。

#### 【0017】

試料中の被分析物に対するレセプターに結合させた着色粒子は、試料液に固体のまま添加して混合した後に捕捉体が結合した担体を通過させてもよく、または着色粒子を緩衝液等に希釈し、この希釈液と被分析物を含む試料液とを混合した後に担体を通過させてもよい。着色粒子を希釈する液は、後述する試料浮遊液について記載されるものを使用すること

10

20

30

40

50

ができる。着色粒子を希釈する場合の希釈倍率は、着色粒子の種類、抗体の性能により変動するので当業者が適切な濃度となるように適宜決定することができる。

例えば抗体を結合した金コロイドの場合、530nmでの吸光度が1.0～10の金コロイド溶液を使用した場合には、例えば金コロイド溶液1（容量）に対して、試料溶液（試料液）を0.1～20（容量）の割合で、すなわち約1～20倍希釈程度で使用できる。

#### 【0018】

また、着色ラテックスを使用する場合には、0.0001w/v%～0.01w/v%程度の範囲で使用できる。

着色粒子を溶液または懸濁液として使用する場合、または多孔質性パッドに吸着させる際に希釈するための溶媒としては、燐酸塩緩衝生理食塩水、またはGoodの緩衝液等の緩衝液が挙げられ、さらにタンパク質（カゼイン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、精製グロブリン画分など）、さらには糖類（マンニトール、トレハロース、ソルビトール、シュクロース、グルコースなど）等を含むことが好ましい。

10

#### 【0019】

##### （基準明度）

明度とは表面色の明るさの性質を意味するが、本明細書では明度を、最低の明度である黒を0とし、最高の明度である白を255として、両者の間に割りつけた数値で表すものとする。本発明の方法において、基準となる“所定の明度を有する領域”における明度、すなわち基準明度は、いずれの値のものを用いてもよい。所定の明度を有する領域、すなわち基準明度を有する領域は、本発明の方法における被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体上にあってもよく、また、担体上になく、別のプレート上にあってもよい。

20

#### 【0020】

##### 〔担体〕

本発明において、担体とは、試料中の被分析物を捕捉し、かつ被分析物に由来する呈色を形成するための担体である。

担体は、水に不溶性の支持体であり、被分析物を捕捉するための捕捉体（後述）が結合、または固定化されている。担体の例としては膜またはフィルター等のシート状担体や球状担体が挙げられる。このような膜またはフィルターは、試料中に含まれる被分析物以外の物質及び後述する着色粒子等の試薬を通過させることができるような一定のポアサイズを有するものであれば特に制限はない。一般に市販されているものであればいずれでもよいが、好適には濾紙、ニトロセルロース、アセテート混ニトロセルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニリデンジフルオライド等が用いられる。

30

#### 【0021】

また担体のポアサイズは上述したように、被分析物及びその他の試薬の大きさ等に依るため、特に規定されないが、0.22μm～12μm程度が最もよく用いられる。

#### 【0022】

##### 〔捕捉体〕

被分析物を捕捉する捕捉体とは、被分析物と特異的に反応し、複合体を形成しえるレセプター等を意味する。従って、被分析物により使用する捕捉体が異なることは当然であるが、一般には被分析物が細菌、ウイルス、ホルモン、その他臨床マーカー等の場合には、これらに対し特異的に反応して結合するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等が挙げられる。そのほか、ウイルス抗原、ウイルス中空粒子、遺伝子組換え大腸菌発現タンパク質、遺伝子組換え酵母発現タンパク質等が挙げられる。

40

#### 【0023】

担体への捕捉体の固定化（結合）方法は、物理的吸着であってもよく、または化学的な結合によるものであってもよい。捕捉体が結合した担体の調製は、例えば、捕捉体を緩衝液等に希釈した溶液を担体に吸着してその後乾燥することにより行われる。

#### 【0024】

##### 〔撮像手段〕

本発明において、撮像手段は、上記試料中の被分析物に由来する呈色領域と所定の明度（

50

基準明度)を有する領域を同時に撮影する手段である。具体的には、明度を測定する装置が搭載されたCCDカメラが挙げられる。CCDカメラを用いた場合、撮影した画像信号を、市販のコンピュータ用ソフトを使用してコンピュータにより処理し、明度を数値化する。

#### 【0025】

##### 〔被分析物〕

本発明の方法により、細菌、ウイルス、ホルモン、その他臨床マーカー等の様々な抗原、抗体等の試料中の被分析物を定量的に測定することができる。

#### 【0026】

##### 〔測定方法〕

本発明の測定方法について以下説明する。

本発明の測定方法は、酵素免疫測定法、免疫イムノクロマトグラフ法、免疫フィルター法等として知られている方法に適用可能である。特にフロースルーアッセイ法と呼ばれる迅速免疫測定法において効果を奏する(フロースルーアッセイ方法については、“Guide to Diagnostic Rapid Test Device Components”, 2<sup>nd</sup> edition, published by Schleicher & Schuell company, January 2000, Edited by Lisa Vickers, p6-8、及び特公平7-34016号(ハイブリテック)公報参照)。

#### 【0027】

本発明の測定方法の好ましい実施態様として、試料中のインフルエンザウイルス濃度を定量する場合について記載する。

例えば、ニトロセルロースメンブレンのような担体上の所定領域に所定濃度のインフルエンザウイルスに対する第一の抗体(捕捉体)を固定化する。前記所定領域上に、試料浮遊液に所定倍率で希釈した試料希釈液を一定量滴下する。滴下後、洗浄液で所定領域を洗浄する。次に、酵素で標識したインフルエンザウイルスに対する第二の抗体(試薬)を含む溶液を前記所定領域上に滴下し、第一抗体/インフルエンザウイルス抗原/酵素標識化第二抗体の複合体を形成させる。前記酵素により分解され発色する基質を含む溶液を滴下し、酵素反応により基質を分解して呈色領域を形成する。前記呈色領域と所定の明度を有する領域を有する基準プレートを同じ視野内で、明度測定装置を搭載したCCDカメラ(オムロン社製、F150-S1A)により同時に撮像する。各領域の明度を数値化し、明度比を演算する。

得られた明度比を、インフルエンザウイルス抗原の標準試料から予め作成した、明度比とインフルエンザウイルス抗原の濃度の関係を示す検量線と対比することにより、試料中のインフルエンザウイルス抗原の濃度を測定することができる。

#### 【0028】

##### 〔装置〕

本発明の方法に使用される装置は、呈色を利用して試料中の被分析物を測定するための装置であって、少なくとも試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び所定の明度を有する領域を有する基準プレートを備えたものである。本発明の方法に使用される装置は、その目的等により、例えば、試料滴下のためのアダプターを担体上に有するものであってもよい。

本発明の装置の一つの実施態様についてその模式図を図1及び図2に示す。図1は装置の平面図であり、図2は、図1のI-I'切断端面図である。図1及び2において、aは、調製した試料(試料液)を滴下する開口部を有し、底面部に試料が通過するための穴(Aホール)及びネガティブコントロール用の穴(Bホール)を備えたアダプターである。Cは基準明度を有する領域である。bは被分析物に対するレセプターが結合した担体であり、cは基準明度を有する領域を有する基準プレートである。

#### 【0029】

また、本発明の装置がフロースルーアッセイ法を利用する測定方法に使用される場合(以

10

20

30

40

50

下、フロースルーアッセイ装置と呼ぶ)には、上記構成の他に、担体へ滴下した試料液等の液体を吸収する液体吸収部材を、担体の下部に有することが好ましい。このような液体吸収部材としては、ガラス繊維、セルロース、あるいはこれらの混合物等の材料が挙げられる。また、液体の吸収が迅速に進行するように、液体吸収部材はレセプターが結合した担体と接触または密着していることが好ましい。このような担体と接触または密着した液体吸収部材が存在することにより、試料液の液体等の担体通過が促進され、迅速な検出を可能とする。

#### 【0030】

##### 〔試料浮遊液〕

本発明において試料は、例えば患者の咽頭・鼻腔等から綿棒等を使用して採取するか、または鼻腔吸引液等を用いることができるが、このようにして得られた試料は、通常試料浮遊液に浮遊させてアッセイを行う。したがって、本発明のキットに前記試料浮遊液が含まれていてもよい。試料浮遊液としては、免疫拡散法、酵素免疫測定法、凝集法等の免疫学的手法による試料検出または定量法において通常使用されるバッファー類等を使用することができる。

より具体的には、生理食塩水、リン酸緩衝性生理食塩水(PBS)、ゼラチン添加PBS、ウシ血清アルブミン(BSA)添加PBS、グッドの緩衝液、子牛インフュージョンブロス(VIB)、ハートインフュージョンブロス、イーグルの最小必須培地(EMEM)、BSA添加EMEMなどが挙げられるがこの限りではない。また、上記バッファー類は2種類以上を組み合わせて用いてもよい。

また、さらに上記組成に加えて、塩基性アミノ酸、無機塩類および/または界面活性剤を添加することもできる。塩基性アミノ酸、無機塩類および界面活性剤の少なくとも二種類を含む試料浮遊液を使用することにより、試料中に含まれる被分析物以外の成分の担体や担体に結合したレセプターへの非特異的な結合を軽減させることができ好ましい。

#### 【0031】

##### 〔キット〕

本発明の呈色を利用して前記被分析物濃度を測定するためのキットは、少なくとも試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体、前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬、及び所定の明度を有する領域を有する基準プレートを含むものである。さらに必要により、試料浮遊液、着色粒子希釈液、標識化酵素に対する基質液、酵素反応停止液を含んでいてもよい。

また、必要に応じて、キットの活性を検査するためのバッファーのみからなる陰性コントロール液、抗原性物質などの被分析物を含むバッファーからなる陽性コントロールを含んでいてもよい。さらに、試料を濾過するためのフィルターや滅菌綿棒を含んでいてもよい。

また、本発明のキットは、CCDカメラ等の撮像装置、撮影した画像信号を処理するためのソフト等を更に含んでいてもよい。

#### 【0032】

##### 〔品質管理方法〕

上述した測定方法は、試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬を含む装置またはキットの製造における品質管理にも使用することができる。すなわち、免疫反応を利用して試料中の被分析物を担体上に捕捉する、イムノメンブレン法、イムノクロマトグラフ法、イムノフィルター法等においては、被分析物を捕捉する捕捉体や被分析物に対し結合する試薬は、抗原または抗体が使用されるが、抗原や抗体の調製はばらつきが大きく、品質を一定に管理することが難しい。しかし、本発明の方法を用い、標準抗原や標準抗体等の活性がわかっている抗原や抗体の濃度を定量的に測定することにより、キット中の捕捉体や試薬の活性度を定量的に測定することができ、品質管理を精度良く行うことができる。

#### 【0033】

以下、本発明の品質管理方法について、キットの品質管理方法を例に説明する。

10

20

30

40

50



試料中の被分析物を捕捉する捕捉体が結合した担体及び前記被分析物に結合しかつ呈色を形成する試薬を含む、呈色を利用して前記被分析物濃度を測定するためのキットを製造する。捕捉体が結合した担体上の領域に、活性（濃度）が既知である標準被分析物を所定倍率で希釈した液を一定量滴下する。滴下後、洗浄液でその領域を洗浄する。次に、金コロイドで標識した試薬を含む溶液を前記領域上に滴下し、捕捉体／標準被分析物／試薬を形成させて、呈色を得る。前記呈色領域と所定の明度を有する領域を有する基準プレートを同じ視野内で、CCDカメラにより同時に撮像する。各領域の明度を測定し、明度比を計算する。

得られた明度比を、インフルエンザウイルス抗原の標準試料から予め作成した、明度比とインフルエンザウイルス抗原の濃度の関係を示す検量線と対比することにより、試料中のインフルエンザウイルス抗原の濃度を測定して、標準被分析物の有すべき濃度と対比することにより、キットの活性を測定することができ、一定値に達しないキットは不良であると判断できる。

【0034】

【実施例】

〔実施例1〕

本実施例は、試料中のインフルエンザウイルス抗原について、本発明の方法により抗原濃度を定量的に測定した例である。

以下の試薬及び装置を用いた。

#### 1. モノクローナル抗体の作製

（抗A型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体（マウス）の作製）

精製A型インフルエンザウイルス抗原を免疫し、一定期間維持したBALB/cマウスから脾臓を摘出し、ケラーらの方法（Kohler et al., Nature, vol. 256, p 495-497 (1975)）によりマウスミエローマ細胞（P3×63）と融合した。

得られた融合細胞（ハイブリドーマ）は、37℃インキュベーター中で維持し、A型インフルエンザウイルスNP抗原固相プレートを用いたELISAにより上清の抗体活性を確認しながら細胞の純化（単クローン化）を行った。

取得した該細胞株をプリスタン処理したBALB/cマウスに腹腔投与し、約2週間後、抗体含有腹水を採取した。得られた腹水から硫酸分画法によってIgGを精製した。これを食用色素赤色102号（株式会社三幸製）0.05%（w/v）を含むクエン酸緩衝液（pH5.0）で希釈して（濃度）となるように調製して使用した。

【0035】

#### 酵素標識抗体A型

アルカリフォスファターゼ標識抗A型インフルエンザモノクローナル抗体、及びアジ化ナトリウム（保存剤）を0.08%（w/v）を含む溶液

【0036】

#### 洗浄液

保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08%（w/v）含む、トリス塩酸緩衝塩化ナトリウム液（pH7.0）

#### 基質液

5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸（150μg/ml）、及びニトロテトラゾリウムブルー（300μg/ml）を含む溶液（SIGMA社製）

#### 反応停止液

クエン酸水溶液（21mg/ml）

【0037】

#### 3. アッセイ装置

アッセイ装置は図1および図2に示すものと同じ構成を有するものを用いた。基準明度Cとしては、“デルリン白”ポリアセタール樹脂（デュポン製）を用いた。

#### 4. 抗体の担体への固定化

10

20

30

40

50

担体はニトロセルロースメンブレンを用いた。固定化は、抗体溶液をニトロセルロースメンブレンへスポットして行った。装置のAホールには抗A型インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体が含まれる溶液を一定量スポットした。抗体を希釈する緩衝液は10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。また、Bホールにはネガティブコントロールとして、A型抗原液をスポットした。スポット後、45℃の乾燥室で60分間乾燥を行った。

#### 【0038】

##### 5. 検量線の作成

$3 \times 10^5 \times (1/2^2)$  pfu/ml の濃度のインフルエンザウイルスA型抗原 (保存されているA型北京株2種類) を2倍、4倍、8倍、及び16倍に順次希釈し、それぞれを、上述したように作成したデバイス上のAホールに150  $\mu$ l ずつ滴下し、“6. 測定” で述べる方法と同様に呈色を形成し、呈色領域の明度 (Aホール内の呈色) と所定の明度を有する領域 (基準明度C) の明度比を得て、明度比と抗原濃度との関係を示す検量線を得た (図3)。なお、Bホールの結果をネガティブコントロール (濃度0) として用いた。

#### 【0039】

##### 6. 測定

測定試料として、濃度  $3 \times 10^5 \times (1/2^4)$  pfu/ml に希釈したインフルエンザウイルスA型抗原を使用して行った。150  $\mu$ l の試料をAホールに気泡を入れないように滴下し、メンブレン上に液がなくなるまで常温に静置した。その後Aホールに酵素標識抗体A型を150  $\mu$ l 滴下しメンブレン上に液がなくなるまで常温に静置した。Aホールのアダプターを取り外した後、Aホールに洗浄液を150  $\mu$ l 滴下し、メンブレン上に液がなくなるまで常温に静置した。Aホールに基質液を150  $\mu$ l 滴下し、常温に10分間静置した。Aホールに反応停止液を150  $\mu$ l 滴下しメンブレン上に液がなくなるまで常温に静置した。

反応停止後、洗浄、自然乾燥し、Aホール内の呈色領域と基準プレート上の基準明度を有する領域CをCCDカメラ (オムロン社製可変明度測定領域設定機能付カメラ) により同時に撮像した。撮像を10回繰り返して、基準明度に対するAホールの領域の明度の比を得た (表1)。

#### 【0040】

##### 【表1】

10

20

30

	基準明度 (S)	Aホール明度 (A)	明度比 (A/S)
1	145.88	122.00	83.63
2	146.00	121.50	83.22
3	147.38	122.63	83.21
4	142.50	119.12	83.60
5	146.88	122.63	83.49
6	146.12	121.75	83.32
7	144.38	120.63	83.55
8	145.88	121.50	83.29
9	146.38	122.00	83.35
10	144.75	120.63	83.33

10

20

## 【0041】

表1のA/S値の平均値とそれぞれの検量線とを比較し、試料中のインフルエンザA型ウイルス濃度を $0.17 \times 10^5$  pfu/mlと決定できた。

## 【0042】

## 【実施例2】

実施例1で作製したものと同一デバイスを用いて、インフルエンザウイルス抗原を従来の定性的測定では測定限界であった濃度に希釈して、ネガティブコントロールとの差別化ができるかを検討した。

30

インフルエンザウイルスA型抗原を $0.19 \times 10^5$  pfu/ml濃度までPBSにより希釈した溶液をそれぞれ19用意した。ネガティブコントロールとしてPBS溶液を用意した。

各液を実施例1で作製したものと同一デバイスの、Aホールに $150 \mu\text{l}$ ずつ滴下し、それぞれ実施例1と同様に、呈色形成、撮像及び明度比の処理を行った。得られた結果を発色度合分布図として表した(図4)。図4における横軸は各液につけた番号を意味しており、縦軸は発色度合分布を表す。

図4から、従来の目視等により呈色の度合を見る定性的測定では、陰性であるかどうかの判定が困難であった被分析物の限界濃度においても、本発明の方法により、陽性と判断できることがわかる。

40

## 【0043】

## 【発明の効果】

本発明の呈色を利用した試料中の分析対象の定量方法、装置及びキットにより、従来定量化が困難であった試料中の被分析物濃度を精度よく定量的に測定することができる。また、本発明の品質管理方法により、呈色を利用して試料中の被分析物を測定する装置及びキットの品質管理を行うことができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアッセイ装置の一例の平面図である。

50

【図2】図1のI-I'切断端面図である。

【図3】本発明の方法で用いる検量線を示す。

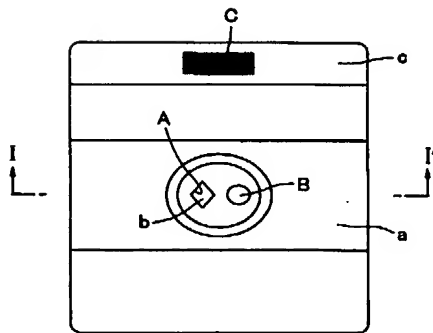
【図4】検出限界濃度の被分析物とネガティブコントロールの測定結果を示す。

【符号の説明】

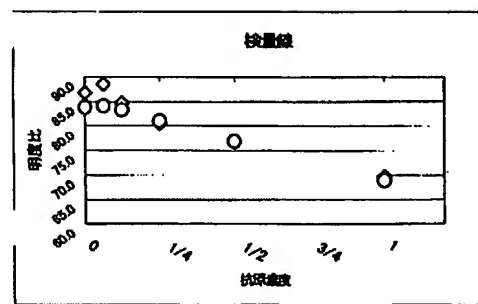
- A : 穴
- B : 穴
- C : 基準明度領域
- a : アダプター
- b : 担体
- c : 基準プレート

10

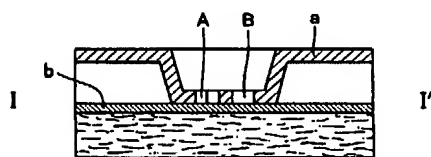
【図1】



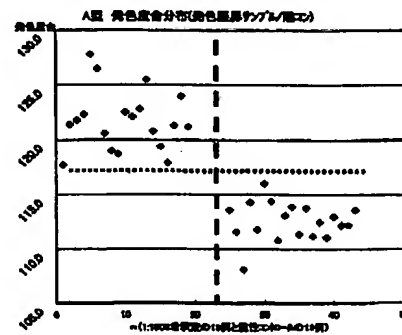
【図3】



【図2】



【図4】



フロントページの続き

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 松永 利視

新潟県五泉市南本町1-2-2 デンカ生研株式会社内

Fターム(参考) 2G042 AA01 DA08 DA10 FB07 FC01 HA07

2G045 AA25 BA11 FA11 FA18 FA19 FB03 FB16 FB17 GC12

2G054 AA06 AA07 AB04 AB05 BA02 BB04 CA21 EA06 FA01 GB04

GB05 GE06 GE07 JA06